

Z0050045Z A

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生と進展に関わる  
分子病態の解析とその臨床応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 立 松 正 衛

平成18（2006）年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生と進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用 …… 1  
主任研究者 立松正衛

## II. 分担研究報告

1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析…………… 13  
立松正衛（愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部）
2. 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析 …………… 18  
瀬戸加大（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究 …………… 22  
稲垣昌樹（愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部）
4. クロマチン構造異常と発がんとの関連 …………… 27  
長田啓隆（愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部）

# I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

ヒト腫瘍の発生と進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用

主任研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所副所長

研究要旨：本研究では (a) 消化器がん転移の分子病態の解明とその臨床応用、(b) 造血器腫瘍および (c) 肺癌などの難治がんにおける遺伝子異常の癌発生に於ける役割、ならびに (d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明を試みている。本年度の主たる成果は以下のようである。

(a) (1) 胃がん腹膜転移の播種性進展にTNF- $\alpha$ が関与し、TNF- $\alpha$ 阻害に化学療法を併用することにより腹膜転移を効果的に抑制可能なこと、(2) 肝転移した分化型胃癌は高率にHER2を過剰発現し、肝転移由来HER2高発現細胞株はgefitinibに対し高感受性を示すことを明らかにした。(b) (1) 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する遺伝子異常API2-MALT1に関し、同遺伝子の標的遺伝子のひとつがAPI2であること、(2) MALT1遺伝子の細胞内局在がNES(Nuclear Exporting Signal)により制御されていること、(3) array CGH法を用いて、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T/NKリンパ腫、急性前骨髄球性白血病に特徴的なゲノム異常を見出した。(c) (1) クロマチン構造制御への関与が示唆されている小RNA分子の中でmicroRNA (miRNA)について検討し、小細胞肺癌を中心に高発現を示すmiRNA群を見出した。また(2) 高悪性度肺癌に見られる神経内分泌分化に注目し、この分化誘導因子ASH1をRNAiにより抑制することにより、細胞死誘導が起こり、マウスの移植肺癌でも増殖が抑制されることを見出した。(d) Aurora-B、Plk1などの分裂期キナーゼ群の癌の染色体不安定性における役割に関し、(1) Plk1がCdk1によるリン酸化反応依存性にINCENPまたはピメンチンに結合すること、(2) この結合により、分裂中期から後期への進行および中間径フィラメントの均等分配が制御されていることを明らかにした。

分担研究者	所属施設名	職名
立松正衛	愛知県がんセンター研究所	副所長
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	部長
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長
長田啓隆	愛知県がんセンター研究所	室長

A. 研究目的

(a) 消化器がんでは (1) 胃がん腹膜転移の発生・進展過程の分子基盤の解明とそれに

基づく治療法の開発、(2) 胃がん肝転移由来 HER2 高発現細胞の増殖機構の解析とそれに基づいた胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法の開発  
(b) 造血器腫瘍では (1) MALT リンパ腫発症に関わる API2-MALT1 キメラ遺伝子の腫瘍化機能を調べるために、その標的遺伝子を明らかにし、さらに種々の欠失変異体を作成し、蛋白レベルの解析を行う。

(2) これまでに確立した **array CGH** 法を用いて、種々の造血器腫瘍に特徴的なゲノム異常の有無を明らかにする。

(c) 肺癌では (1) 小 RNA 分子の中の **miRNA** の異常の有無と、その異常の肺癌発症・進展およびクロマチン構造制御への関与の解明、(2) 神経内分泌分化とヒト肺癌悪性化の関連、およびこの神経内分泌分化が肺癌治療の分子標的になりうるか否かの検討。

(d) 染色体の不安定性における分裂期キナーゼ群の役割の解析では (1) **Cdk1** と **Plk1** のシグナル伝達のクロストーク機構の解明とそれを通じた発がん過程における分裂期キナーゼの役割の解明、(2) 染色体不安定性における **Aurora-B**、**Plk1** などの分裂期キナーゼ群の役割の解明と新たな作用機序の抗がん剤開発への応用。

## B. 研究方法

(a) 消化器がん転移における分子病態の解析

(1) **TNF- $\alpha$**  などのサイトカインを欠失したノックアウトマウス (**TNF- $\alpha$  KO**)、これに野生型 (**C57BL**) マウス骨髄を移植したキメラマウスおよび同系マウス (**C57BL**) 由来の **Lewis** 肺癌転移モデル (**P29**) を用いて腹膜転移の初期・進展過程に及ぼす **TNF- $\alpha$**  の役割を **in vivo** で検討する。

(2) **GFP** 遺伝子導入ヒト胃がん腹膜微小転移モデルを用いて、抗ヒト **TNF- $\alpha$**  抗体を用いた抗サイトカイン療法の腹膜転移抑制効果を検討する。

(3) 胃がん肝転移巣から **HER2** 高発現細胞株を樹立し、各種シグナル伝達阻害剤を用いてそれらの増殖機構を明らかにする。

(4) 上記 **HER2** 高発現細胞株を用いて分子標的治療薬 **Trastuzumab (Herceptin)**、**Gefitinib (Iressa)** の **in vitro** における増殖抑制効果、**in vivo** における抗腫瘍効果を検討する。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常の解析

(1) **MALT** リンパ腫発症に関与する **API2-MALT1** キメラ遺伝子の標的遺伝子を明らかにするために、遺伝子導入細胞株と親株との間で発現差異のある遺伝子を **Expression profiling** 法で明らかにし、そのプロモーター領域を解析し、真の標的遺伝子であることを確認する。

(2) **API2-MALT1** の蛋白レベルの研究を進めるため、欠失変異体を含む種々の発現ベクターを構築し、細胞内での局在を調べる。

(3) これまでに確立した **array CGH** 法を用いて、新たな造血器腫瘍を解析し、病型特異的なゲノム異常を明らかにする。

(4) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫のゲノム異常を詳細に解析するために、2300 個の **BAC clone** を用いた **array CGH** 法を確立し、検体を用いて、遺伝子異常を解析する。

(c) 肺癌における遺伝子異常の解析

(1) 癌関連遺伝子群・クロマチン構造制御遺伝子群を標的候補遺伝子とする **miRNA 21** 種を選択し、肺癌細胞株における発現を、**Northern blot** 法、及び定量 **RT-PCR** 法等を用いて検討した。肺癌で強発現を示した **miRNA** に関しては、発現 **vector** を作成し、肺癌細胞へ導入し、細胞増殖等の変化を検討した。

(2) 神経内分泌分化を誘導する転写因子 **ASH1** の発現ベクター及び、**ASH1** に対するプラスミド及びアデノウイルス **RNAi** ベクターを作成し、肺癌細胞株に導入し、細胞周期停止・細胞死誘導は **FACS** にて解析した。更に、**SCID** マウス背部皮下に肺癌細胞株を移植して **ASH1-RNAi** アデノウイルスを腫瘍内注入する治療実験もおこなった。

(c) 細胞分裂期の制御に必須な分裂期キナーゼ群の機能解析

(1) **Cdk1** による **INCENP** リン酸化反応の生理的意義の解析 **RNA 干渉法 (RNAi)** によって **INCENP** または **Aurora-B** の発現を低下させたとき、**Plk1** の動原体局在がどのように変化するかを解析した。ま

たマウス **INCENP** の野生型 (WT) およびそれぞれのリン酸化部位をリン酸化されないアラニンに置換した変異体をレトロウィルスの系で導入し **HeLa** 細胞株をそれぞれ樹立し、ヒトに特異的な **ds RNA** を用いて、内因性の **INCENP** の発現のみを **RNAi** で低下させたときの分裂期の表現型を観察した。

(2) **Cdk1** によるビメンチンリン酸化反応の生理的意義の解明 **Cdk1** リン酸化ビメンチンと **Plk1** の結合を **Far-Western** 法および **GST-pull down** 法で確認した。

さらに上記の **Plk1** のリン酸化反応の生理的意義を解明するため、**Plk1** のビメンチンリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を細胞に発現し、その表現型を検討した。

(倫理面への配慮)

実験に用いたレトロウィルス等は愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会承認されたプロトコールに基づき、指定を受けた研究領域のみで使用している。

### C. 研究結果

(a) 消化器がん転移における分子病態の解析

(1) 胃がん腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析

**TNF- $\alpha$  KO** マウスでは野生型マウスに比べマウス **Lewis** 肺がん細胞の腹膜転移巣の発育・増殖に有意な差は認められなかったが、播種性進展が抑制され、生存日数の有意な延長が認められた。一方、キメラマウスにおいては播種性進展の促進と生存の短縮が認められた。これらの結果から宿主側の **TNF- $\alpha$** 、特に腹腔内炎症細胞の産生する **TNF- $\alpha$**  が腫瘍の腹膜播種性進展に重要な役割を果たしていること、しかし **TNF- $\alpha$**  は転移腫瘍の増殖には影響しないことが示唆された。

(2) 胃がん腹膜転移の分子病態に基づいた新しい治療法の開発

上記のように **TNF- $\alpha$**  単独では腹膜転移腫

瘍の増殖を抑制しないことから化学療法 (パクリタキセル) との併用により腹膜転移抑制の増強がみられるか否かを検討した。その結果、野生型マウスに比べ、**TNF- $\alpha$  KO** マウス化学療法群では単なる生存の延長にとどまらず、一部のマウスでは転移の消失、すなわち治癒が認められ、化学療法に **TNF- $\alpha$**  阻害療法を併用することが腹膜転移の治療にきわめて効果的であることが明らかとなった。

次に **GFP-遺伝子** を導入して作成したヒト胃癌腹膜微小転移ヌードマウスモデルを用いて、抗ヒト **TNF- $\alpha$**  抗体 (**infliximab**, **Remicade**) を用いた抗サイトカイン療法の腹膜転移抑制効果を検討した。その結果、対照群に比べて **infliximab** 腹腔内投与群では腹水貯留率の減少と生存率の有意な延長が認められた。以上の結果はヒト胃癌腹膜転移モデルにおいても、抗ヒト **TNF- $\alpha$**  抗体を用いた抗サイトカイン療法により腹腔内播種性進展が抑制されうること示唆している。

(3) 胃がん肝転移巣由来 **HER2** 高発現細胞株の樹立とそれを用いた増殖機構の解析

肝転移した分化型胃癌は高率に **HER2** を高発現していることを見だし、この肝転移巣から **HER2** 高発現胃がん細胞株 3 株 (**GLM-1**, **GLM-2**, **GLM-4**) を独自に樹立した。これらの胃がん細胞株では **EGFR** 下流のシグナル伝達経路として **ras/MAPK** 経路ではなく、**PI3K/Akt** 経路が恒常的に活性化されていた。そこでこれらの細胞を **PI3K** 阻害剤 (**LY294002**) で処理したところ強いアポトーシス誘導が起こることを見いだした。**MAPK** 阻害剤 (**U0126**) では誘導されないことから、これら **HER2** 高発現胃がん細胞株はその生存を **HER2** 過剰発現によって活性化された **PI3K/Akt** 経路に依存していることが明らかとなった。

(4) 上記分子基盤に基づいた胃がん肝転移

に対する新しい分子標的治療法の開発

これら **HER2** 高発現胃癌細胞株に対する分子標的治療として **Trastuzumab** および **Gefitinib** 感受性を調べたところすべての細胞株が *in vitro* において **Trastuzumab** ではなく **Gefitinib** に対し高い感受性を示すことを見出した。**Gefitinib** はヌードマウス移植腫瘍においても抗腫瘍効果を示した。**Gefitinib** の **HER2** 下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べたところ **HER2** 高発現胃癌細胞株では **Akt** のリン酸化が抑制されたのに対し、**HER2** 低発現胃癌細胞株では **Akt** のリン酸化は抑制されなかった。以上のことから **Gefitinib** は **HER2** 過剰発現によって活性化された **PI3K/Akt** 経路を間接的にブロックすることによりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常の癌発生に於ける役割

(1) **API2-MALT1** キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索

**API2-MALT1** キメラ遺伝子導入 **Hela** 細胞株を樹立し、親株との間で発現差異のある遺伝子を **Expression profiling** 法で解析したところ、キメラ遺伝子の一方の遺伝子 **API2** そのものが標的遺伝子であることが明らかとなった。そのプロモーター領域をクローニングし、ルシフェレースをマーカーに転写活性を検討したところ、確かに標的であることが明らかとなった。

(2) **API2-MALT1** の蛋白レベルの解析

**MALT** リンパ腫発症に関与するキメラ遺伝子 **API2-MALT1** の蛋白レベルの研究では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた **MALT1** および **API2-MALT1** は細胞質と核を往復することが明らかとなった。種々の欠失変異体を作成し検討したところ、その分子機構として、**MALT1** に存在する **Nuclear Exporting Signal (NES)** が機能

していることが明らかとなった。

(3) **array CGH** 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析

本年度はマントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫(**DLBCL**)の亜型(**GCB**型と**ABC**型)、**T/NK** リンパ腫・白血病、**TEL-AML1** キメラ型小児白血病について解析を進めた。

1)マントル細胞リンパ腫では従来法 **CGH** で報告されていたとおり **11q22**、**13q21**、**13q34** の欠失が高頻度に認められた。その検出頻度は従来法の **CGH** よりも頻度が高かった。。

2) **DLBCL**の発現解析による細分類である **GCB**型と**ABC**型でゲノム異常様式は大きく異なっていることを明らかにした。。また、**CD5+DLBCL**は**ABC**型とよく似ており、**CD5-CD10+DLBCL**は**GCB**型とよく似ていることが明らかとなった。

3) **T/NK**リンパ腫・白血病および急性前骨髄球性白血病(**APL**)の解析

**Aggressive NK cell leukemia** と

**Extranodal NK/T** 細胞リンパ腫(鼻型)はその類似性が指摘されていたが、今回の 27 症例を用いた **array CGH** 解析により両者はゲノム異常様式が異なることが明らかとなった。また、30 症例の **APL** について **array CGH** を行ったところ、約 60%の症例で特徴的なゲノム異常が認められたが、40%程度の症例ではゲノム異常が認められず、リンパ腫とは異なり、**APL** ではゲノム異常の数が少ないことが明らかとなった。

(c) 肺癌における遺伝子異常の癌発生に於ける役割

(1) 選択した **miRNA** の肺癌細胞株における **miRNA mature form** の発現を **Northern blot** にて検討した。すると、染色体 13 番上の **miRNA** クラスター **miR-17-92** が小細胞肺癌を中心に強発現パターンを示

した。小細胞肺癌患者検体を用いて Northern blot を施行すると、やはり全例でこのクラスター由来 miRNA の強発現が見られた。

このクラスターは、最近リンパ腫での遺伝子増幅が報告された C13orf25 遺伝子上に存在する。この C13orf25 遺伝子自体も miR-17-92 と同様に強発現をしていた。そこで、次に、C13orf25 と miR-17-92 のどちらの強発現が肺癌発症進展へ関与しているか検討するため、両発現ベクターを肺癌細胞へ導入して、細胞増殖に対する作用を検討した。その結果、miR-17-92 は肺癌細胞の増殖を促進し、C13orf25ORF は促進効果を示さなかった。

(2) 転写因子 ASH1 に対するプラスミド RNAi ベクターを作成し、これを肺癌細胞株へ導入、細胞増殖を検討したところ、ASH1 を発現する肺癌細胞株でのみ、細胞増殖の抑制が見られた。発現抑制作用を示した肺癌細胞株を解析したところ、細胞周期停止・細胞死の誘導により、細胞増殖抑制が起こることが判明した。次に SCID マウスにヒト肺癌細胞を移植して、がん治療実験を施行した。皮下移植した肺癌細胞の腫瘍に ASH1-RNAi アデノウイルスを腫瘍内注入して、対照ウイルスと比較した。すると、ASH1-RNAi を発現する肺癌細胞では、腫瘍径・重量の増加が対照に比して有意に少なく、腫瘍増殖抑制が見られた。

(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明

(1) Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義

INCENP が Plk1 と結合しうるかを Far-Western 法を用いて検討したところ、INCENP は Cdk1 によるリン酸化反応依存性に Plk1 と結合しうることを判明した。この結合は T388A の場合では認められないことから、Plk1 は Cdk1 によってリン酸化さ

れた T388 を認識して INCENP に結合していることが判明した。さらに、INCENP の発現を RNAi で低下させたとき、Plk1 の中心体局在は保たれるものの、動原体への局在は阻害されていた。

さらに、INCENP の T59 または T388 のリン酸化反応の生理的意義を検索するため、マウス INCENP の WT、T59A、または、T388A を導入した HeLa 細胞株において、ヒト由来（内因性）の INCENP の発現のみを RNAi で低下させたときの細胞の表現型を観察した。その結果、WT および T59A を導入した細胞においては、Plk1 の動原体局在の回復が認められたが、T388A を導入した細胞では約半分ほどしか回復が認められなかった。また、T388A を導入した細胞では、WT および T59A を導入したものに比べて、分裂中期から後期への進行が遅くなっていることが判明した。以上のことから、Cdk1 は INCENP のリン酸化反応を通じて、Plk1 の動原体局在を制御していること、動原体の Plk1 は、分裂中期から後期への進行に重要な役割を担っていることが判明した。

(2) Cdk1 によるビメンチンリン酸化反応の生理的意義

我々は、これまで Cdk1 が分裂前中期から中期までビメンチンをリン酸化することを明らかにしてきたが、その生理的意義は不明のままであった。本年度は、Plk1 が Cdk1 によってリン酸化されたビメンチンのセリン 55 と直接結合し、そのキナーゼ活性を著しく上昇させることを明らかにした。この活性化 Plk1 は、さらに、ビメンチンのセリン 82 をリン酸化することから、Cdk1 による分裂期特異的なビメンチンのリン酸化反応は、Plk1 をビメンチンへと集積させることを介して、Plk1 によるビメンチンのリン酸化反応を制御していることが判明した。



#### D. 考察

(a) 消化器がん転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 胃癌腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析とそれに基づいた新しい治療法の開発

我々は胃癌腹膜転移は発生と播種性進展の2段階からなる事を既に明らかにしている。本年度は TNF- $\alpha$  KO マウス、キメラマウスを用いた解析から TNF- $\alpha$  は上記2段階のうち後者、すなわち腹膜転移の播種性進展過程に選択的に関与することを明らかにした。実際、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を用いたヌードマウスモデル実験によりヒト胃癌細胞の腹膜転移の播種性進展を抑制できることを明らかにした。ただし、この場合、用いた抗体は抗マウスではなく抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体であり、今後、抗マウス TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体を作成し、これを併用した実験で検証する必要がある。

腫瘍に対する増殖促進作用や免疫抑制作用などの可能性から抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を癌患者に治療薬として実際に投与することは現在、基本的には許可されておらず、上記抗サイトカイン療法の実用化に際しては TNF- $\alpha$  抗体の代わりに NF- $\kappa$ B 阻害剤などシグナル伝達阻害薬の投与の可能性も考えられ、現在、検討中である。

(2) 胃癌肝転移巣由来 HER2 高発現細胞の増殖機構の解析と新しい分子標的治療法の開発

HER2を高発現する細胞のうち2株はHER2遺伝子増幅を伴うが、EGFRに遺伝子変異は認められず、GLM細胞のgefitinib感受性は肺がんに見られるような遺伝子変異によるものではない。HER2高発現胃癌細胞株におけるPI3K/Akt経路の恒常的活性化は、HER2過剰発現によるHER2/HER3ヘテロダイマーの形成と、それに引き続く

PI3K regulatory subunitのHER3へのリクルートによるものと考えられる。従って、gefitinibの抗腫瘍効果の作用機序としてはこのHER2/HER3ヘテロダイマー形成を間接的に抑制することによりPI3K/Akt経路を遮断し、Apoptosisを誘導するものと予想されるが、この点については今後さらに精細な検討が必要である。

一方、TrastuzumabはHER2高発現胃癌細胞に対してin vitroでは軽度の増殖抑制効果を示すのみで、gefitinibと比較してシグナル伝達阻害やApoptosis誘導作用は極めて弱かった。しかし、予備的なデータではあるがTrastuzumabはin vivoにおいてはHER2高発現胃癌細胞に対してgefitinibと同等かそれ以上の抗腫瘍効果を発揮することを見出している。これは主として抗体依存性細胞障害(ADCC)によるものと予想される。

胃癌の肝転移は再発頻度こそ10-20%と低いといった再発した患者の予後は極めて不良であり、これに対し現状では有効な治療法がほとんどない。胃癌肝転移の少なくとも40%程度はHER2高発現胃癌と考えられることから、今後これらに対しGefitinibとTrastuzumabという全く作用機序の異なる新しい分子標的治療の可能性が示唆される。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常の癌発生に於ける役割

(1) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索

Expression profiling法で解析したところ、約50個程度の遺伝子が有意に発現上昇していることを見出し、その中に転座に加わるAPI2遺伝子そのものが見出された。そのプロモーター領域をクローニングし、その領域に存在する3つのNF- $\kappa$ B結合サイトを点突然変異を入れて、解析したところ、第一番目と第3番目の結合モチーフが主要な役

割を担っていることが明らかとなった。

### (2) API2-MALT1 の蛋白レベルの解析

細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質と核を往復することが明らかとなった。この核・細胞質間のシャットリングは機能を考える上で重要な意義がある。事実、MALT1 蛋白は BCL10 を核外に搬出するが、API2-MALT1 にはその機能がないことが明らかとなった。また、種々の欠失変異体による検討で、Nuclear Exporting Signal (NES) を見出し、これが機能していることを明らかにしたことも重要である。また、BCL10 の細胞内局在にも NES シグナルが重要な働きを示していることを明らかにしたが、キメラ遺伝子には BCL10 を核外に運び出す能力が欠けていることが明らかとなり、症例における BCL10 免疫染色とキメラ遺伝子の有無とがよく相関することが初めて明らかとなったことは、BCL10 の病的意義を確認する上で重要な発見と考える。

### (3) array CGH 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析

1) マントル細胞リンパ腫ではこれまでの方法と比較し、より高頻度に欠失を検出することができた。また 2q13 領域のホモ欠失領域の責任遺伝子として、BCL2 蛋白と拮抗する機能を有する BIM 遺伝子を見出した。マントル細胞リンパ腫の発祥機構を考察する上で重要である

2) DLBCLの発現解析による細分類である GCB型とABC型について、それぞれに特徴的なゲノム異常が存在することを見出し、発現解析による分類がゲノム異常の観点からも妥当な分類であることを示唆したことは、意義深い。

### 3) T/NKリンパ腫・白血病および急性前骨髄球性白血病(APL)の解析

aggressive NK cell leukemia と Extranodal NK/T 細胞リンパ腫(鼻型)は共

に EB ウイルスが関連する aggressive 型として認識されており、類似性が指摘されていたが、今回の検索の結果、両者は異なるゲノム異常様式を有しており、異なる疾患単位であると考えられる。また、APL について array CGH では、約 60%の症例で特徴的なゲノム異常が認められたものの、40%程度の症例ではゲノム異常が認められず、今後の検討が必要である。現在用いているアレイでは検出できない異常があるのか、あるいはアレイ技術では見出せない点突然変異などの異常があるのかについて検討する必要がある。

### (c) 肺癌における遺伝子異常の癌発生に於ける役割

(1) 肺癌で強発現を示す miRNA クラスター miR-17-92 が見出され、癌細胞の増殖制御に関与する可能性が示唆された。しかし、最近の報告では miRNA は従来の予想を超えて多数の標的遺伝子を制御すると考えられ、実際この miRNA クラスターの標的も種々のシグナル伝達系に係わる遺伝子群やクロマチン構造を制御する遺伝子群等の多数の遺伝子群が含まれている。又この miRNA 強発現が小細胞肺癌の組織型と相関を示すことから、小細胞肺癌を中心にみられる神経内分泌分化との関連も示唆される。今後、この miRNA 強発現に伴う複雑な分子病態を解明し、癌治療に貢献できる治療標的を検討していくことが必要と考えている。

(2) 今回の実験結果は、神経内分泌分化を誘導する転写因子 ASH1 が肺癌細胞の増殖・癌悪性化に関与することを示唆し、また ASH1 が癌治療の標的となる可能性も示唆した。この神経内分泌分化は ASH1 シグナルと Notch シグナルのバランスで誘導されていると考えられており、この神経内分泌分化に関連したシグナルが肺癌治療にお

いて重要な位置を占めると思われる。

ASH1 自身が治療標的となる可能性が示唆されたが、ASH1 欠失マウスでは、自律神経系や内分泌細胞に異常が見られ、ASH1 を治療標的とした場合の危険性も考えられる。したがって現在、ASH1 下流分子の検討も進めており、これら ASH1 で発現制御される遺伝子群を解析することで、安全で高効率な新たな治療標的が見出されてくることも予想される。

(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明

これまでの研究で、個々の分裂期キナーゼの役割は少しずつ明らかにされてきた。分裂期の細胞現象は複数の分裂期キナーゼが協調しながら制御していると考えられているが、その詳細は不明な点が多かった。今回、我々が得た知見は、Cdk1 の基質のリン酸化反応を介して Plk1 の局在および機能を制御していること、この機能変化が分裂期の進行に重要な役割を担っていることを示すものといえる。今後、このような分裂期キナーゼ群間のクロストーク機構の破綻が癌化においてどのような役割を演じているかについても検討を加えていき、将来的には、新しい作用機序の抗がん剤の開発に役立てる予定である。

#### E. 結論

(a) TNF- $\alpha$  KO マウスと同系マウス腫瘍を用いた解析から胃がんの播種性進展に TNF- $\alpha$  が重要な役割を担っていることを明らかにした。またヒト胃癌の播種性転移が抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体により抑制され、腹水貯留の減少、生存期間の延長が見られることをヌードマウスモデルを用いて明らかにした。

肝に転移した分化型胃癌では高率に HER2 の高発現が見られ、同部から樹立した HER2 高発現細胞株が gefitinib に対し高い感受性を示すことを明らかにした。こ

の高感受性は HER2 過剰発現により恒常的に活性化された PI3K/Akt シグナル伝達経路の gefitinib による遮断によるアポトーシス誘導に起因することを明らかにした。

(b) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子ひとは転座に関与する API2 であることを見出した。API2-MALT1 の蛋白レベルの解析では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 が細胞質と核を往復することを明らかにした。

T/NK リンパ腫・白血病および急性前骨髄球性白血病(APL)では、疾患特異的なゲノム異常を見出したが、APL では 40%の症例でゲノム異常が認められず、今後の問題として対処する必要がある。

(c) クロマチン構造制御への関与が示唆されている小 RNA 分子に注目し、小 RNA 分子の中の miRNA クラスターが小細胞肺癌を中心に高発現を示すことを見出した。更にその miRNA クラスターが肺癌の増殖を促進することを確認した。又、高悪性度肺癌に見られる神経内分泌分化に注目し、この分化誘導因子 ASH1 を RNAi で抑制することで、肺癌で細胞周期停止・細胞死が誘導され、マウスの治療実験でも腫瘍増殖が抑制されることが確認された。

今回の解析結果は、多様な組織型を示す肺癌の分子病態が、組織型に密接に関連する多様な細胞分化の特性と密接に関係していることを示唆し、同時に肺癌治療標的の多様性をも示唆していると考えられる。

(d) Cdk1 による INCENP およびビメンチンリン酸化反応を介して、Plk1 の局在、活性およびその機能が調節されていることを見出した。この Plk1 の機能変化は、分裂中期から後期への進行および中間径フィラメントの均等分配過程に重要な役割を担っていることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 発表論文

1. Yokoyama H., Nakanishi H., Kodera Y., Ikehara Y., Ohashi N., Ito Y., Koike M., Fujiwara M., Tatematsu M., Nakao A., Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Clin. Cancer Res.* 12(2); 361-68, 2006.
2. Kodera Y., Nakanishi H., Ito S., Mochizuki Y., Ohashi N., Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M., Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: Analysis of real time RT-PCR after 5 years of follow-up. *J Am Coll Surg.* 202(2); 231-6, 2006.
3. Ito S., Nakanishi H., Kodera Y., Mochizuki Y., Tatematsu M., Yamamura Y., Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients. *Br. J. Cancer*, 93 (9) ; 986-92, 2005.
4. Ohashi N, Kodera Y, Nakanishi H, Yokoyama H, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M. Efficacy of intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel targeting peritoneal micrometastasis as revealed by GFP-tagged human gastric cancer cell lines in nude mice. *Int. J. Oncol.* 27(3) ; 637-44, 2005.
5. Yamachika T, Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Niwa T, Wanibuchi H, Tatematsu M., Fukushima S. Establishment and characterization of a human colonic mucinous carcinoma cell line with predominant goblet-cell differentiation from liver metastasis. *Pathol Int.* 55(9): 550-7, 2005.
6. Futamura N, Nakanishi H, Hirose H, Nakamura S, Tatematsu M. The effect of storage on the survival of cancer cells in blood and efficient elimination of contaminating cancer cells by a leukocyte depletion filter. *Am Surg.* 71(7): 585-90, 2005.
7. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, Tatematsu M., Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. *Gastric Cancer.* 8(3):142-8, 2005.
8. Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Yokoyama H, Munesue S, Kodera Y, Tatematsu M. Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. *Clin. Exp. Meta.* 22:137-147, 2005.
9. Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, Tatematsu M. Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene-tagged tumor models in mice. *Methods Mol Med.* 111:351-62, 2005.
10. Niwa T, Ikehara Y, Nakanishi H, Tanaka H, Inada K, Tsukamoto T, Ichinose M, Tatematsu M. Mixed gastric- and intestinal-type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation. *J Histochem Cytochem.* 53(1): 75-85, 2005.
11. Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M. Helicobacter pylori-dependent NF-kappa B activation in newly

- established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci.* 96(3):170-5, 2005.
- 1 2. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 24: 1348-1358, 2005.
  - 1 3. Fujii, A., Oshima, K., Hamasaki, M., Utsunomiya, H., Okazaki, M., Kagami, Y., Seto, M., Kikuchi, M.: Differential expression of cytokines, chemokines and their receptors in follicular lymphoma and reactive follicular hyperplasia: Assessment by complementary DNA microarray. *Oncol. Rep.*, 13: 819-824, 2005.
  - 1 4. Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 106:1770-1777, 2005.
  - 1 5. Hosokawa, Y., Suzuki, H., Nakagawa, M., Lee, TH., Seto, M.: API2-MALT1 fusion protein induces transcriptional activation of the API2 gene through NF-kappaB binding elements: evidence for a positive feedback loop pathway resulting in unremitting NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334: 51-60, 2005.
  - 1 6. Nakashima, Y., Tagawa, H., Suzuki, R., Karnan, S., Karube, K., Ohshima, K., Muta, K., Nawata, H., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of Natural killer cell lymphoma/leukemia: Different genomic alteration patterns of aggressive NK-cell leukemia and extranodal NK/T lymphoma, Nasal type. *Genes Chrom. Cancer*, 44: 247-255, 2005.
  - 1 7. Tagawa, H., Seto, M.: A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia Correspondence*, 19: 2013-2016, 2005.
  - 1 8. Sawa, M., Yamamoto, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Hishida, A., Kajiguchi, T., Seto, M., Kohno, A., Kitamura, K., Itoh, Y., Asou, N., Hamajima, N., Emi, N., Naoe, T.: BMI-1 Is Highly Expressed in M0-Subtype Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Hematol.*, 82:42-47, 2005.
  - 1 9. Nakagawa, M., Hosokawa, Y., Yonezumi, M., Izumiyama, K., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Asaka, M., Seto, M.: MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10. *Blood*, 106:4210-4216, 2005.
  - 2 0. Kasugai, Y., Tagawa, H., Kameoka, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Identification of CCND3 and BYSL as Candidate Targets for the 6p21 Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 11:8265-8272, 2005.
  - 2 1. Karnan, S., Tsuzuki, S., Kiyoi, H., Tagawa, H., Ueda, R., Seto, M., Naoe, T.: Genomewide array-based comparative genomic hybridization analysis of acute promyelocytic leukemia. *Genes Chrom. Cancer*, 45:420-425, 2006.
  - 2 2. Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T and Takahashi T. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and

- clinicopathologic behaviors. *J Clin Onco* (in press).
23. Maeno K, Masuda A, Yanagisawa K, Konishi H, Osada H, Saito T, Ueda R, and Takahashi T. Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth of human lung cancers. *Oncogene* 25: 271-7, 2006
24. Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, and Takahashi T. The *ASH1* gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res.* 65: 10680-5, 2005
25. Osada H\*, Hayashita Y\*, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yasushi Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, and Takahashi T. A polycistronic miRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65: 9628-32, 2005 (\* equal contributors)
26. Osada H, Tatematsu Y, Sugito N, Horio Y, and Takahashi T. Histone modification in the *TGFBR2* gene promoter and its significance for responsiveness to HDAC inhibitor in lung cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 44: 233-41, 2005
27. Anumanthan G, Halder SK, Osada H, Takahashi T, Massion PP, Carbone DP, Datta PK. Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells. *Br J Cancer.* 93: 1157-67, 2005
28. Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of *Dicer* associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96: 111-5, 2005
29. Nagata, K. and Inagaki, M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. *Oncogene* 24: 65-76, 2005
30. Nishizawa, M., Izawa, I., Inoko, A., Hayashi, Y., Nagata, K., Yokoyama, T., Usukura, J. and Inagaki, M. Identification of trichoplein, a novel keratin filament-binding protein. *J.Cell Sci.* 118: 1081-1090, 2005
31. Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H. and Inagaki, M. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). *Genes Cells* 10: 127-137, 2005
32. Tsui, J., Inagaki, M. and Schulman, H. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 280: 9210-9216, 2005
33. Dyson, M.H., Thomson, S., Inagaki, M., Goto, H., Arthur, S.J., Nightingale, K., Iborra, F.J. and Mahadevan, L.C. MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *J.Cell Sci.* 118: 2247-2259, 2005
34. Stefanovic, S., Windsor, M., Nagata, K., Inagaki, M. and Wileman, T. Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J. Virol.* 79: 11766-11775,

- 2005
- 3 5. Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J. and Kaibuchi, K. Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell Biol.* 25: 9973-9984, 2005
- 3 6. Yamaguchi, T., Goto, H., Yokoyama, T., Silljé, H., Hanisch, A., Uldschmid, A., Takai, Y., Oguri, T., Nigg, E.A. and Inagaki, M. Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J. Cell Biol.* 171: 431-436, 2005
- 3 7. Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., Hayashi, Y., Kinoshita, M. and Nosaka, T. Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol. Cell. Biol.* 25: 10965-10978, 2005
- 3 8. Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M. and Parker, P.J. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 24: 3834-3845, 2005
- 3 9. Izawa, I. and Inagaki, M. Cleavage furrow kinases and cell division. *Signal Transduction of Cell Division.* 73-92, 2005
- 4 0. Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A. and Inagaki, M. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nature Cell Biology* 8: 180-187, 2006
- 4 1. Izawa, I. and Inagaki, M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science* in press
- 4 2. Shiromizu, T., Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F. and Inagaki, M. Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells* in press
- 4 3. Oguri, T., Inoko, A., Shima, H., Izawa, I., Arimura, N., Yamaguchi, T., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Kikuchi, K. and Inagaki, M. Vimentin-Ser82 as a memory phosphorylation site in astrocytes. *Genes Cells* in press

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

出願特許

仮出願番号：未定

出願日：2005年 4月 19日

発明の名称：リンパ腫の予後・病型診断  
法

出願人：愛知県、日本ガイシ㈱

発明者：瀬戸加太、田川博之、吉田安子、  
吉良茂樹

## II. 分担研究報告書



厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

分担研究者 立松正衛 愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：消化器がん患者の予後を左右する胃がん腹膜転移の分子機構および胃がん肝転移の増殖機構を解析し、以下の諸点を明らかにした。1) TNF- $\alpha$  ノックアウト (KO) マウスを用いた解析から胃がんが初期転移巣から乳斑の存在しない腹膜に播種性に進展するのに TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが重要な関与をすること、2) TNF- $\alpha$  KO マウスに化学療法を施行することにより野生型マウスに比べ著名な生存延長と、一部では治癒も得られること、さらにヒト胃癌の播種性転移が抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体により抑制され、腹水貯留の減少、生存期間の延長が見られること、3) 胃癌肝転移巣、特に分化型（腸型）腺癌では高率に HER2 の高発現が見られ、同部から樹立した HER2 高発現細胞株（3株）が EGFR の特異的キナーゼ阻害剤である gefitinib に対し高感受性を示すこと、4) この高感受性は HER2 過剰発現により恒常的に活性化された PI3K/Akt シグナル伝達経路の gefitinib による遮断によるアポトーシス誘導に起因すること、などを明らかにした。

A. 研究目的

1. 胃がん腹膜転移の発生および進展過程の分子基盤の解明。
2. 上記分子基盤に基づいた胃がん腹膜転移に対する新しい治療法の開発。
3. 胃がん肝転移巣由来 HER2 高発現細胞株の樹立とそれを用いた増殖機構を解析。
4. 上記分子基盤に基づいた胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法の開発。

B. 研究方法

- 1 TNF- $\alpha$  などのサイトカインを欠失したノックアウトマウス (TNF- $\alpha$  KO)、これに野生型 (C57BL) マウス骨髄を移植したキメラマウスおよび同系マウス (C57BL) 由来の GFP-遺伝子導入 Lewis 肺癌転移モデル (P29-GFP) を用いて腹膜転移の初期・進展過程に及ぼす TNF- $\alpha$  の役割を *in vivo* で検討する。
- 2 腹膜転移をマウス体外からリアルタイム

にモニターできる GFP 遺伝子導入ヒト胃がん腹膜微小転移モデルを用いて、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を用いた抗サイトカイン療法の腹膜転移抑制効果を検討する。

3 胃がん肝転移巣から HER2 高発現細胞株を樹立し、各種シグナル伝達阻害剤を用いてこれらの増殖機構を明らかにする。

4 上記 HER2 高発現細胞株を用いて EGFR ファミリーに対する分子標的治療薬である Trastuzumab (Herceptin), Gefitinib (Iressa) などの *in vitro* における増殖抑制効果、*in vivo* における抗腫瘍効果を検討する。

C. 研究結果

(1) 胃がん腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析

TNF- $\alpha$  KO マウスでは野生型マウスに比べマウス Lewis 肺がん細胞の腹膜初期転移巣形

成率およびその後の発育・増殖に有意な差は認められなかったが、腹壁腹膜や横隔膜など乳斑の存在しない腹腔内組織への播種性進展が抑制され、生存日数の有意な延長が認められた。一方、TNF- $\alpha$  KO マウスに野生型骨髄を導入したキメラマウスにおいては TNF- $\alpha$  発現腹腔マクロファージが腹腔内に遊走する結果、播種性進展の促進と生存の短縮が認められた。これらの結果からホスト側の TNF- $\alpha$ 、特に腹腔内炎症細胞の産生する TNF- $\alpha$  が腫瘍の腹膜播種性進展に重要な役割を果たしていること、しかし TNF- $\alpha$  は転移腫瘍の増殖には影響しないことが示唆された。

#### (2) 胃がん腹膜転移の分子病態に基づいた微小転移を標的とする新しい治療法の開発

上記のように TNF- $\alpha$  単独では腹膜転移腫瘍の増殖を抑制しないことから化学療法（パクリタキセル PTX、毎週1回、8週間）との併用により腹膜転移抑制の増強がみられるか否かを検討した。その結果、野生型マウスでは化学療法を施行してもごく軽度の生存の延長が見られるにすぎなかったのに対し、TNF- $\alpha$  KO マウスでは単なる生存の延長にとどまらず、一部のマウスでは転移の消失、すなわち治癒が認められ、化学療法に TNF- $\alpha$  阻害療法を併用することが腹膜転移の治療にきわめて効果的であることが明らかとなった。

次に上記同系マウス腫瘍モデルで得られた知見がヒト胃がんにおいても成り立つか否かを明らかにするため、GFP-遺伝子を導入して作成したヒト胃癌腹膜微小転移ヌードマウスモデルを用いて、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体 (infliximab, Remicade) を用いた抗サイトカイン療法の腹膜転移抑制効果を検討した。その結果、対照群に比べて infliximab 腹腔内投与群（週2回、5週間）では腹水貯留率の減少と生存率の有意な延長が認められた。以上の結果はヒト胃がん腹膜転移モ

デルにおいても、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を用いた抗サイトカイン療法により腹腔内播種性進展が抑制されうることを示唆している。

#### (3) 胃がん肝転移巣由来 HER2 高発現細胞株の樹立とそれを用いた増殖機構の解析

我々は肝転移した分化型胃癌（腸型）は高率に HER2 を高発現していることを見だし、この肝転移巣から HER2 高発現胃がん細胞株3株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) を独自に樹立した。これらの胃がん細胞株では EGFR 下流のシグナル伝達経路として ras/MAPK 経路ではなく、PI3K/Akt 経路が恒常的に活性化されていた。そこでこれらの細胞を PI3K 阻害剤 (LY294002) で処理したところ強いアポトーシス誘導が起こることを見いだした。MAPK 阻害剤 (U0126) ではアポトーシスは誘導されないことから、これら HER2 高発現胃がん細胞株はその生存を HER2 過剰発現によって活性化された PI3K/Akt 経路に依存していることが明らかとなった。

#### (4) 上記分子基盤に基づいた胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法の開発

これら HER2 高発現胃がん細胞株に対する分子標的治療として Trastuzumab および Gefitinib 感受性を調べたところすべての細胞株が in vitro において Trastuzumab ではなく Gefitinib に対し高い感受性を示すことを見出した。Gefitinib はヌードマウス移植腫瘍においても抗腫瘍効果を示した。Gefitinib の HER2 下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べたところ HER2 高発現胃がん細胞株では Akt のリン酸化が抑制されたのに対し、HER2 低発現胃がん細胞株では Akt のリン酸化は抑制されなかった。以上のことから Gefitinib は HER2 過剰発現によって活性化された PI3K/Akt 経路を間接的にブロックすることによりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

#### D. 考察

##### (1) 胃癌腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析とそれに基づいた新しい治療法の開発

我々は GFP-遺伝子を導入して作成した胃癌腹膜微小転移モデルを用いた *in vivo* の解析からマウスにおいては胃癌の初期の腹膜転移は腹腔内のどこにでも起こる訳ではなく、乳斑に限局して選択的に起こること、乳斑での腫瘍の増大に引き続いて乳斑の存在しない組織に播種性に進展してゆく事、すなわち胃癌腹膜転移は発生・進展の2段階からなる事を既に明らかにしている。本年度は TNF- $\alpha$  KO マウス、キメラマウスを用いた解析から TNF- $\alpha$  は上記2段階のうち後者、すなわち腹膜転移の播種性進展過程に選択的に関与することを明らかにした。実際、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を用いたヌードマウスモデル実験によりヒト胃癌細胞の腹膜転移の播種性進展を抑制できることを明らかにした。ただし、この場合、用いた抗体は抗マウスではなく、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体でありそれでも播種性進展を抑制することから、この場合の転移抑制は腫瘍の分泌する TNF- $\alpha$  によるケモカインおよびケモカイン受容体の発現を抑制することにより間接的に腹腔炎症細胞の TNF- $\alpha$  分泌を抑制するためと考えられる。今後、抗マウス TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体を作成し、これを併用した実験で検証する必要がある。

腫瘍に対する増殖促進作用や免疫抑制作用などの可能性から抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を癌患者に治療薬として実際に投与することは現在、基本的には許可されておらず、上記抗サイトカイン療法の実用化に際しては TNF- $\alpha$  抗体の代わりに NF $\kappa$ -b 阻害剤などシグナル伝達阻害薬の投与の可能性も考えられ、現在、検討中である。

##### (2) 胃癌肝転移巣由来 HER2 高発現細胞の増殖機構の解析と新しい分子標的治療法の開発

GLM-1, GLM-2およびGLM-4細胞はHER2を高発現し、うち2株はHER2遺伝子増幅を伴っていたがEGFRの発現は低く、遺伝子変異も認められなかった。HER2高発現胃癌細胞株におけるPI3K/Akt経路の恒常的活性化はPI3K/Aktを負に制御するPTENの抑制によるものではなく、HER2過剰発現によるHER2/HER3ヘテロダイマーの形成と、それに引き続くPI3Kの regulatory subunitのHER3へのリクルートによるものと考えられる。従って、gefitinibの抗腫瘍効果の作用機序としてはこのHER2/HER3ヘテロダイマー形成を間接的に抑制することによりPI3K/Akt経路を遮断し、Apoptosisを誘導するものと予想されるが、この点については今後さらに精細な検討が必要である。

現在、HER2高発現乳がんに対して臨床的に使用されているTrastuzumabはHER2高発現胃癌細胞に対して*in vitro*では軽度の増殖抑制効果を示すのみで、gefitinibと比較してシグナル伝達阻害やApoptosis誘導作用は極めて弱かった。しかし、予備的なデータではあるがTrastuzumabは*in vivo*においてはHER2高発現胃癌細胞に対してgefitinibと同等かそれ以上の抗腫瘍効果を発揮することを見いだしている。これは主としてTrastuzumabのFC領域とNK細胞などのFC受容体の結合を介した抗体依存性細胞障害(ADCC)によるものと予想される。

胃癌の肝転移は再発頻度こそ10-20%と低いがいったん再発した患者の予後は極めて不良であり、これに対し現状では有効な治療法がほとんどない。胃癌肝転移の少なくとも40%程度はHER2高発現胃癌と考えられることから、今後これらに対しGefitinibとTrastuzumabという全く作用機序の異なる新しい分子標的治療の可能性が示唆される。

#### E. 結論

- (1) TNF- $\alpha$  KO マウスと同系マウス腫瘍を用いた解析から胃がんの播種性進展に TNF- $\alpha$  が重要な関与をすることを明らかにした。
- (2) ヒト胃癌の播種性転移が抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体により抑制され、腹水貯留の減少、生存期間の延長が見られることをヌードマウスモデルを用いて明らかにした。
- (3) 胃癌肝転移巣、特に分化型腺癌では高率に HER2 の高発現が見られ、同部から樹立した HER2 高発現細胞株 (3 株) が EGFR の特異的キナーゼ阻害剤である gefitinib に対し高い感受性を示すことを明らかにした。
- (4) この高感受性は HER2 過剰発現により恒常的に活性化された PI3K/Akt シグナル伝達経路の gefitinib による遮断によるアポトーシス誘導に起因することを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Yokoyama H., Nakanishi H., Kodera Y., Ikehara Y., Ohashi N., Ito Y., Koike M., Fujiwara M., Tatematsu M., Nakao A., Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Clin. Cancer Res.* 12(2); 361-68 (2006)
2. Kodera Y., Nakanishi H., Ito S., Mochizuki Y., Ohashi N., Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M., Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: Analysis of real time RT-PCR after 5 years of follow-up. *J Am Coll Surg.* 202(2); 231-6 (2006)
3. Ito S., Nakanishi H., Kodera Y., Mochizuki Y., Tatematsu M., Yamamura Y., Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients. *Br. J. Cancer,* 93 (9) ; 986-92 (2005)
4. Ohashi N, Kodera Y, Nakanishi H, Yokoyama H, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M. Efficacy of intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel targeting peritoneal micrometastasis as revealed by GFP-tagged human gastric cancer cell lines in nude mice. *Int. J. Oncol.*27(3) ; 637-44 (2005)
5. Yamachika T, Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Niwa T, Wanibuchi H, Tatematsu M., Fukushima S. Establishment and characterization of a human colonic mucinous carcinoma cell line with predominant goblet-cell differentiation from liver metastasis. *Pathol Int.* 55(9): 550-7 (2005)
6. Futamura N, Nakanishi H, Hirose H, Nakamura S, Tatematsu M. The effect of storage on the survival of cancer cells in blood and efficient elimination of contaminating cancer cells by a leukocyte depletion filter. *Am Surg.* 71(7): 585-90 (2005)
7. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, Tatematsu M., Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. *Gastric Cancer.* 8(3):142-8 (2005)